



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/81, 1/18, 9/02, C12G 3/08, A21D 8/04, C12P 7/20	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/41888 (43) Date de publication internationale: 27 décembre 1996 (27.12.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/00854 (22) Date de dépôt international: 6 juin 1996 (06.06.96) (30) Données relatives à la priorité: 95/06835 9 juin 1995 (09.06.95) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE - INRA [FR/FR]; 147, rue de l'Université, F-75341 Paris Cédex (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): DEQUIN, Sylvie [FR/FR]; 52, cours Gambetta, F-34000 Montpellier (FR). BARRE, Pierre [FR/FR]; 90, rue des Lavandes, F-34980 Saint-Gely-du-Fesc (FR). (74) Mandataire: CABINET ORES; 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(54) Title: YEAST STRAINS HAVING A MODIFIED ALCOHOLIC SUGAR FERMENTATION BALANCE, USES THEREOF, AND VECTORS FOR PRODUCING SAID STRAINS		
(54) Titre: SOUCHES DE LEVURES PRESENTANT UN BILAN DE FERMENTATION ALCOOLIQUE DES SUCRES MODIFIÉ ET LEURS APPLICATIONS, VECTEURS UTILISABLES POUR L'OBTENTION DESDITES SOUCHES		
(57) Abstract		
<p>Yeast strains having a modified alcoholic sugar fermentation balance, in particular as far as the production of glycerol and ethanol is concerned, and vectors or sequences for producing said strains, are disclosed. Said yeast strains are selected from <i>Saccharomyces</i> strains and contain at least one fragment of a gene coding for an NADH-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH), said fragment being modified by regulating sequences active in yeast comprising a strong promoter, for increasing the production of glycerol and reducing that of ethanol, in a sugar-rich medium during alcoholic fermentation.</p>		
(57) Abrégé		
<p>Souches de levures présentant un bilan de fermentation alcoolique des sucres modifié, notamment en ce qui concerne la production de glycérol et d'éthanol, vecteurs ou séquences, utilisables pour l'obtention desdites souches. Lesdites souches de levures sont sélectionnées parmi des souches de <i>Saccharomyces</i>, contiennent au moins un fragment d'un gène codant pour une glycérol 3 phosphate déshydrogénase NADH-dépendantes (GPDH), lequel fragment est modifié par des séquences de régulation actives dans la levure comportant un promoteur fort, pour augmenter la production de glycérol et réduire la production d'éthanol, dans un milieu riche en sucres pendant la fermentation alcoolique.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

**SOUCHES DE LEVURES PRESENTANT UN BILAN DE FERMENTATION
ALCOOLIQUE DES SUCRES MODIFIE ET LEURS APPLICATIONS,
VECTEURS UTILISABLES POUR L'OBTENTION DESDITES SOUCHES.**

La présente invention est relative à des
5 souches de levures présentant un bilan de fermentation
alcoolique des sucres modifié, notamment en ce qui
concerne la production de glycérol et d'éthanol.

La présente invention est également relative à
des vecteurs ou des séquences, utilisables pour
10 l'obtention desdites souches.

Le glycérol est un composé extrêmement impor-
tant dans les fermentations alcooliques industrielles
réalisées par des levures, notamment parce qu'il s'agit
du principal sous-produit de fermentation après l'éthanol
15 et le CO₂.

La production de glycérol, réalisée dans le
cytoplasme, commence par la réduction du dihydroxyacétone
phosphate (DHAP) en glycérol-3-phosphate, par une glycé-
rol 3 phosphate déshydrogénase NADH-dépendante (GPDH, EC
20 1.1.1.8). L'enzyme est fortement inhibée par des concen-
trations élevées en éthanol (NAGODAWITHANA et al. J. Am.
Soc. Brew. Chem. 39, p. 179-183, 1977), des solutions de
force ionique importante ainsi que par différents métabo-
lites et cofacteurs [NADER et al., Biochem. Biophys.
25 Acta, 571, p. 177-185, (1979)]. Elle est vraisemblable-
ment activée par un ou des effecteurs [GANCEDO et al.,
European Biocem., 5, p. 165-172, (1968)]. Son poids molé-
culaire est de 42 kDa [NILSSON et ADLER, Biochem.
Biophys. Acta, 1034, p. 180-185, (1990)] ; la forme
30 active présente par contre un poids moléculaire de 68
kDa, ce qui semblerait montrer que l'enzyme est active
sous la forme d'un dimère [ALBERTYN et al., FEBS, 308, p.
130-132, (1992)]. Un gène, dénommé GPD1, responsable de
la synthèse de l'enzyme a été récemment cloné et caracté-
35 risé [LARSSON et al., Mol. Microbiol. 10, p. 1101-1111,
(1993) ; ALBERTYN et al., Mol. Cell. Biol. 14, p. 4135-

4144, (1994)], mais sa disruption n'entraîne pas une perte totale d'activité GPDH, ce qui entraîne un maintien de la production de glycérol, y compris en anaérobiose, ce qui suppose l'existence d'un deuxième gène, GPD2, 5 codant pour une isoenzyme.

La deuxième étape consiste en la déphosphorylation du glycérol-3-phosphate en glycérol par l' α -glycérophosphatase (glycérol 3-phosphatase ou G3Pase, EC 3.1.3.21), stéréospécifique du L-glycérol-3-phosphate. 10 Cette étape n'est pas considérée comme limitante.

Alors que le glycérol est produit dans le cytoplasme, les enzymes impliquées dans son assimilation sont, par contre, localisées dans la mitochondrie : glycérol kinase codée par GUT1 et une GPDH flavine adénine 15 dinucléotide (FAD)-dépendante codée par GUT2.

Le gène GPD1 [LARSSON et al., 1993 et ALBERTYN et al., 1994, précités], obtenu à partir de la levure *Saccharomyces cerevisiae* comprend 1176 pb et code pour la GPDH précitée (ou GPD1p), protéine de 391 amino-acides.

20 Le glycérol est synthétisé dans la levure en réponse à deux conditions environnementales différentes :

- Le choc osmotique :

La production de glycérol est augmentée en réponse à ce stress. Le glycérol sert de soluté permettant d'ajuster la pression osmotique intracellulaire en 25 fonction de celle du milieu. Lors du stress osmotique, la synthèse de GPD1p (GPDH exprimée par le gène GPD1) est augmentée de façon importante.

- L'anaérobiose et en particulier l'état redox 30 de la cellule :

La formation du glycérol pendant la fermentation alcoolique est un moyen pour la cellule d'équilibrer sa balance d'oxydoréduction (balance déséquilibrée notamment au cours de la croissance cellulaire), en fournissant un système accepteur d'électrons complémentaire 35 (figure 1).

L'étude de mutants osmosensibles *osgl-1*, (LARSSON et al., 1993, précité), montre qu'ils sont incapables de croître dans un milieu à faible potentiel en eau et présentent à la fois une diminution significative de la production du glycérol et de l'activité de la GPDH.

ALBERTYN et al., 1994, précité, ont également séquencé le même gène *GDP1* et ont plus particulièrement étudié la régulation de l'expression de la *GDP1p* chez *S. cerevisiae* par la voie métabolique HOG (= *High-Osmolarity Glycerol response*). L'effet physiologique prééminent, dans les levures ayant subi un choc osmotique, est l'augmentation intracellulaire de la production de solutés compatibles pour contrebalancer la pression osmotique (essentiellement production de glycérol). Le gène *GDP1* et un taux de production élevé de glycérol sont essentiels à la croissance des levures, en présence d'un choc osmotique.

Pour étudier la régulation de la production de glycérol, ces Auteurs ont réalisé des études de surexpression et de délétion du gène *GDP1*. La surexpression est réalisée en sous-clonant le gène *GDP1* dans un plasmide multicopies *YEplac181* (= *YEpGDP1*). Les transformants (levures de laboratoire) portant le plasmide multicopies *YEpGDP1*, présentent une activité enzymatique *GPDH-NADH* dépendante, supérieure d'un facteur 5 à 7, par rapport à l'activité enzymatique des cellules non transformées ; toutefois, de tels transformants, bien qu'ils surproduisent l'enzyme (*GDP1p*), ne présentent pas de taux plus élevés en glycérol, dans un milieu de culture contenant du glucose, alors que lorsque du galactosé est utilisé à la place du glucose, les mêmes transformants produisent environ 3 à 5 fois plus de glycérol que les cellules non-transformées. Toutefois, l'étude du choc osmotique sur ces cellules transformées, a conduit les Auteurs de cet article à préciser que les cellules surproduisant la *GPDH*

n'apparaissent pas comme étant plus résistantes au choc osmotique que les cellules sauvages, ceci étant sans doute lié au fait qu'elles ne produisent pas plus de glycérol, lors d'une fermentation alcoolique.

5 La modulation de la production de glycérol (augmentation ou diminution) et du rapport glycérol/éthanol, pendant la fermentation alcoolique, présente un intérêt dans l'industrie agro-alimentaire : oenologie, brasserie, distillerie, boulangerie, cidrerie.

10 En oenologie, le glycérol est un composé important en ce qui concerne les qualités organoleptiques du vin. Il apporte notamment une propriété de "moelleux", et un léger goût sucré. La concentration moyenne de glycérol dans les vins est de 5 à 12 g/l ; la variabilité
15 observée dépend de différents paramètres, tels que la composition du milieu et les conditions de croissance, et aussi la nature de la souche utilisée.

L'obtention de teneurs plus élevées en glycérol a deux intérêts majeurs :

20 1) une amélioration des qualités organoleptiques du produit, et

2) une diminution de la teneur en éthanol. En effet, le glycérol produit normalement au cours de la fermentation alcoolique est la résultante du fonctionnement d'un système accepteur d'électrons complémentaire,
25 destiné à équilibrer la balance générale d'oxydoréduction de la glycolyse. Le rôle prépondérant du glycérol en anaérobiose est donc la réoxydation du NADH (figure 1).

L'amplification de la production de glycérol
30 va d'une part limiter le flux de carbone normalement utilisé vers la production de pyruvate puis d'éthanol, et d'autre part, provoquer un déséquilibre de la balance d'oxydoréduction, par utilisation accrue du pool de NADH. Ce déséquilibre pourra être compensé par une limitation
35 de la principale voie impliquée dans la régénération du

NAD (voie de synthèse de l'éthanol) au niveau de la conversion acétaldéhyde vers l'éthanol.

C'est pourquoi la Demanderesse s'est donné pour but de pourvoir à des souches de levures transformées qui répondent mieux aux besoins de la pratique que les souches transformées de l'Art antérieur, notamment en ce qu'elles permettent effectivement l'amplification de la production de glycérol avec une modification concomitante du rapport glycérol/éthanol.

La présente invention a pour objet des souches de levures, caractérisées en ce qu'elles sont sélectionnées parmi des souches de *Saccharomyces*, en ce qu'elles contiennent au moins un fragment d'un gène codant pour une glycérol 3 phosphate déshydrogénase NADH-dépendante (GPDH), lequel fragment est modifié par des séquences de régulation actives dans la levure comportant un promoteur fort, pour augmenter la production de glycérol et réduire la production d'éthanol, dans un milieu riche en sucres pendant la fermentation alcoolique.

On entend, au sens de la présente invention, par milieu riche en sucres, un milieu contenant au moins 30 g/l de sucres (3 %) (glucose, fructose, mélasses, par exemple), de préférence entre 60 g/l (6 %) et 250 g/l (25 %).

Conformément à l'invention, lesdites souches de levures produisent, lorsqu'elles sont ensemencées dans un milieu de fermentation comprenant plus de 30 g/l de sucres, environ 2 à 5 fois plus de glycérol avec une réduction concomitante du taux d'éthanol d'au moins 4 g/l, par rapport à des cellules de levures non transformées et cultivées dans un milieu de fermentation comprenant moins de 30 g/l de sucres.

En outre, le rapport glycérol produit/glucose initial est significativement différent pour les souches transformées (entre 0,07 et 0,15) selon l'invention par rapport aux souches non transformées (0,03-0,04).

Conformément à l'invention, ledit gène codant pour une GPDH est sélectionné dans le groupe constitué par le gène GPD1, le gène GPD2 ou tout gène homologue, apte à coder pour une GPDH.

5 Lesdites souches de *Saccharomyces* sont, de préférence, des souches industrielles, notamment des souches oenologiques, de distillerie, de brasserie, de boulangerie ou de cidrerie.

10 Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, lesdites levures appartiennent à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*.

A titre d'exemple, on peut citer la souche ScV5M, dérivée d'une souche industrielle oenologique.

15 De manière avantageuse, l'invention prévoit, pour l'obtention de souches aptes à une production accrue de glycérol et une réduction de la production d'éthanol, sur un milieu riche en sucres, la construction suivante :

20 Lesdites souches de *Saccharomyces* sont caractérisées en ce qu'elles contiennent au moins deux copies du gène codant pour une GPDH NADH-dépendante (GPD1 ou GPD2), sous contrôle de séquences régulant l'expression dudit gène dans la levure.

25 Par "séquence régulant l'expression d'un gène", on entend des séquences de type promoteur et terminateur actives dans la levure. Les promoteurs et terminateurs de différents gènes peuvent être utilisés, associés à des combinaisons différentes. On utilisera, de préférence, des promoteurs et terminateurs d'un autre gène que le gène GPD1. On citera, à titre d'exemple non
30 limitatif, les promoteurs et terminateurs, connus en eux-mêmes, des gènes alcool-déshydrogénase I (ADHI), phosphoglycérate kinase (PGK) et glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH).

35 L'invention comprend également la cassette d'expression obtenue en associant lesdites séquences de régulation et le gène codant pour une GPDH NADH-

dépendante (GPD1 par exemple) ; cette cassette peut être portée par un plasmide, ou intégrée dans l'ADN chromosomique de la levure hôte.

L'invention englobe également des vecteurs
5 d'expression, comprenant une cassette d'expression telle que définie ci-dessus, et utilisables pour l'obtention des souches de levures transformées conformes à l'invention.

Ces vecteurs pourront être sélectionnés sur la
10 base de la nature et de la force des éléments régulateurs qui entrent dans la cassette d'expression. On peut choisir les promoteurs et terminateurs décrits plus haut, ou tout autre séquence permettant de contrôler l'expression d'un gène dans la levure.

15 Un autre critère du choix des vecteurs réside dans le nombre de copies de ceux-ci, qui est conditionné par le choix de l'origine de répllication.

Conformément à l'invention, le gène GPD1, associé à des séquences de contrôle, est porté par un
20 plasmide répllicatif à haut nombre de copies, possédant comme origine de répllication dans la levure : une partie du plasmide 2 μ endogène, une séquence ARS chromosomique ou des séquences télomériques.

Préférentiellement, les vecteurs conformes à
25 l'invention comportent également des marqueurs de sélection dans la levure, tels que des marqueurs d'auxotrophie : URA₃, LEU₂, HIS₃, TRP₁, ADE etc.... et/ou des marqueurs de résistance aux antibiotiques (G318, hygromycine B, chloramphénicol, pléomycine), à des herbicides
30 (sulfométuron méthyle), au cuivre...

Avantageusement, les vecteurs conformes à l'invention sont des vecteurs navettes, possédant également une origine de répllication bactérienne et un marqueur de sélection dans une bactérie (par exemple, gène
35 de résistance à un antibiotique).

Les plasmides conformes à l'invention, portant le gène codant pour la GPDH-NADH dépendante de levure peuvent être introduits dans toutes souches de levure, par différentes techniques de transformation.

5 Parmi les techniques de transformation les plus courantes, on citera la technique des protoplastes, la technique de perméabilisation aux sels de lithium et l'électroporation.

De manière surprenante, les levures *Saccharo-*
10 *myces*, transformées par un plasmide à haut nombre de copies, dans lequel le gène codant pour une GPDH (gène GPD1 ou gène GPD2) est associé à des séquences régulatrices dudit gène, ont une production accrue en glycérol et une réduction de la production d'éthanol sur
15 un milieu riche en sucres, c'est-à-dire comportant au moins 30 g de sucres/l ; à titre d'exemple, des levures transformées conformes à l'invention permettent l'expression multicopies du gène GPD1 codant pour une GPDH, sous contrôle du promoteur fort ADHI (clone SIM7,
20 par exemple) et ainsi une production significativement accrue de glycérol pendant la fermentation alcoolique dans un milieu contenant 30 g/l de sucres ou plus, alors que l'expression multicopies de ce gène, dans un milieu ne contenant que 20 g/l de sucres, comme décrit dans
25 ALBERTYN et al. (1994), c'est-à-dire sous contrôle de son propre promoteur, dans une levure de laboratoire n'avait jusqu'alors pas permis d'observer une augmentation de la production de glycérol.

Le procédé de construction des souches conformes à l'invention surexprimant la GPDH et en conséquence
30 surproduisant du glycérol, sur un milieu riche en sucres (fermentation alcoolique) comprend les étapes suivantes :

- construction d'une cassette d'expression comprenant le gène codant pour une GPDH (gène GPD1 ou
35 gène GPD2) et des éléments régulateurs forts ;

- introduction de cette cassette en multicopies dans une levure.

Les souches de levures surproductrices de glycérol, conformes à l'invention trouvent de nombreuses applications dans l'agro-alimentaire. Elles sont utilisables partout où une fermentation alcoolique doit s'accompagner à la fois d'une diminution du taux en éthanol et d'une diminution du taux de sucres. Ceci est particulièrement intéressant dans le domaine de l'élaboration de boissons fermentées à teneur allégée en éthanol, que ce soit des vins ou des produits plus récents comme les "cocktails à base de vin". Dans cette dernière catégorie, par exemple, la teneur en sucre ne doit pas dépasser 80 g/l, et le degré final d'alcool 4°C, ce qui suppose l'utilisation de moûts ayant une richesse en sucre de 150 g/l au maximum, ce qui est rarement le cas. D'autres modèles tels que les pétillants de raisin sont également concernés.

De façon plus générale, on constate, depuis quelques années, une tendance affirmée de la consommation pour des produits moins riches en sucre mais aussi en éthanol, tout en conservant le goût sucré.

Or, les procédés physiques susceptibles d'être mis en oeuvre dans ce but : osmose inverse, évaporation sous vide, présentent dans ce contexte, des limites, dans la mesure où ces techniques, en cours de développement, sont coûteuses et altèrent souvent la qualité des produits. Pour ces raisons, les souches de levure, conformes à l'invention, susceptibles de dégrader plus de sucre en produisant moins d'alcool au profit du glycérol (saveur sucrée) présentent des avantages incontestables. De plus, les levures surproductrices de glycérol, conformes à l'invention, présentent, au niveau de leur mise en oeuvre, l'avantage de ne pas nécessiter d'investissement particulier. En s'affranchissant des métabolismes tradi-

tionnels, on peut obtenir des produits originaux au sein du secteur des boissons fermentées.

Le secteur de la boulangerie est également concerné ; mais dans ce cas, c'est l'augmentation de la production intracellulaire en glycérol qui est recherchée ; de telles levures présentent, en effet, une plus grande osmotolérance et une résistance accrue à la congélation et au séchage.

La présente invention a également pour objet un procédé de fermentation alcoolique à bilan de fermentation des sucres modifié, caractérisé en ce que pour augmenter la production de glycérol et réduire la production d'éthanol, ledit procédé comprend :

(1) la transformation d'une souche de levure *Saccharomyces* par un vecteur surexprimant la protéine GPDH ; et

(2) l'ensemencement du milieu de fermentation, contenant au moins 30 g/l de sucres, avec la souche de levure transformée (transformant), obtenue en (1).

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention, ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 représente la balance d'oxydoréduction pendant la fermentation alcoolique,

- la figure 2 représente la séquence des oligonucléotides O1 et O2 et leurs positions respectives dans le gène GPD1,

- la figure 3 illustre le clonage du gène GPD1 dans le plasmide pGEM-T,

- la figure 4 représente le clonage du gène GPD1 dans le plasmide pVT100-U,

- la figure 5 représente l'évolution de la population cellulaire en fonction de l'avancement de

réaction chez V5p (souche contrôle ScV5M transformée par le plasmide pVT100-U) (○) et SIM7 (souche ScV5M transformée par le plasmide pVT100-U-GPD1) (●),

5 - la figure 6 représente la production de glycérol en fonction de l'avancement de réaction chez V5p (○) et SIM7 (●),

- la figure 7 représente l'évolution de l'activité spécifique GPDH chez V5p (○) et SIM7 (●) en fonction de l'avancement de réaction,

10 - la figure 8 représente l'immunodétection de la protéine GPD1p chez SIM7. Les fractions protéiques sont obtenues à différents moments d'avancement de réaction. Chaque dépôt protéique contient la même quantité de protéine (10 µg),

15 - la figure 9 représente l'évolution de la population cellulaire chez V5p (○) et SIM7 (●), en fonction du temps ($\mu(V5p) = \mu(SIM7) = 0,54$ gén./h),

- la figure 10 représente l'évolution de la concentration en glucose restante dans le milieu chez V5p (○) et SIM7 (●), en fonction du temps (fermentation sur YNB + 5 g/l de casaminoacides pH 3,4, 28°C avec [glucose]=100 g/l),

- la figure 11 représente l'évolution de la production d'acétaldéhyde en fonction de l'avancement de 25 réaction chez V5p (○) et SIM7 (●),

- la figure 12 représente les oligonucléotides utilisés pour isoler la cassette promoteur TEF1-gène ZEO-terminateur CYC1, à partir du vecteur pVT332,

- la figure 13 représente le plasmide recombi- 30 nant pVT100U-ZEO-GPD1,

- la figure 14 illustre l'évolution de production des métabolites produits respectivement par les souches $K_1/pVT100U-ZEO$ (souches contrôles, également dénommées ci-après K_1-pVTU) (■) et les souches transfor-

mées K₁/PVT100U-ZEO-GPD1 (également dénommées ci-après K₁-GPD1) (☒).

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1 : CLONAGE DE GPD1.

Le clonage de GPD1 a été réalisé par amplification PCR, à partir d'ADN total de la souche ScV5M, à l'aide des deux oligonucléotides O1 et O2 (figure 2), choisis à partir de la séquence de GPD1 [LARSSON et al., (1993)]. Cette souche a été déposée le 18 Juin 1992 auprès de la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes, tenue par l'INSTITUT PASTEUR, sous le numéro I-2222. Il s'agit d'une souche haploïde, ura-, MAT a, dérivée d'une souche oenologique.

1) Extraction de l'ADN génomique de ScV5M

La souche ScV5M a été cultivée dans le milieu YEPD, dont la composition est la suivante : extrait de levure 10 g/l, peptone 20 g/l, glucose 20 g/l. 10 ml de milieu YEPD sontensemencés par ScV5M et incubés pendant une nuit à 28°C. 50 ml de même milieu sontensemencés à une DO (660 nm) de 0,05, et incubés à 28°C, jusqu'à atteindre une DO (660 nm) de 4 à 6.

Les cellules sont récupérées par centrifugation pendant 10 minutes à 1000 g et l'ADN extrait selon la méthode décrite par VAN SOLIGEN et VAN DER PLAAT, J. Bacteriol., 130, p. 946-947, (1977), avec quelques modifications :

Le culot cellulaire est repris dans un tampon SCE pH 7 (sorbitol 1,2 M, Na₃ citrate 0,1M, EDTA 60 mM), avec 5 µl/ml de β-mercaptoéthanol, et incubé 15 minutes à température ambiante.

- 5 mg/ml de zymolyase 20000 sont ajoutés à la suspension cellulaire, que l'on place à 37°C pendant 45

minutes, jusqu'à obtention d'un taux de protoplaste supérieur à 90%.

- Les protoplastes sont récupérés par centrifugation 5 minutes à 350 g, puis repris dans 1 ml de tampon de lyse (Tris-HCl 0,2M pH 8, EDTA 0,1M, sarkosyl 1,5%) additionné de 100 µl de protéinase K (20 mg/ml). La solution est incubée 1 h à 50°C.

- La suspension est centrifugée 30 minutes à 15000 g, et le lysat récupéré. L'ADN est précipité par 0,05 volume d'acétate de sodium 3M pH 4,8 et 2 volumes d'éthanol. Le précipité est récupéré à l'aide d'une baguette de verre et dissous dans 500 µl de tampon TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8). La concentration de l'ADN en solution est déterminée par mesure de la DO à 260 nm.

2) Amplification de GPD1 par PCR

A partir de la séquence de GPD1 [LARSSON et al., Mol. Microbiol., 10, p. 1101-1111, (1993)] deux oligonucléotides O1 et O2 ont été synthétisés. O1 est choisi en amont du codon d'initiation de la traduction. O2 est situé après le codon stop. Aux extrémités 5' de chaque oligonucléotide, ont été rajoutées des bases supplémentaires, de façon à introduire un site de restriction XhoI pour O1 et BamHI pour O2. La séquence des oligonucléotides est indiquée sur la figure 2.

Les deux amorces ont été utilisées pour amplifier GPD1, à partir de l'ADN total isolé de ScV5M, dans les conditions suivantes :

Amorce O1	5 µl (20 pmoles)
Amorce O2	5 µl (20 pmoles)
Tampon TaQ 10X (PROMEGA)	10 µl
TaQ (PROMEGA, 5 U/µl)	0,5 µl
dNTP (2 mM)	10 µl (100 ng)
MgCl ₂ (25 mM)	6 µl
H ₂ O	qsp 100 µl

Conditions d'amplification : 30 secondes 94°C, 30 secondes 39°C, 1 minute 72°C pendant 30 cycles, sur amplification Perkin-Elmer Cetus modèle 9600.

Le produit d'amplification est analysé sur gel
5 d'agarose 0,8%. Une seule bande de 1300 paires de bases environ est observée, en accord avec la taille théorique de 1260 pb.

3) Identification du fragment amplifié

Afin de vérifier que le fragment cloné corres-
10 pond à GPD1, le produit PCR a été sous-cloné dans le vecteur PGEM-T (PROMEGA), afin de déterminer partiellement sa séquence. Pour cela, le produit amplifié a été précipité en ajoutant au mélange d'amplification 0,25 volumes d'acétate d'ammonium 10N et 2,5 volumes d'éthanol. Après
15 15 minutes à -20°C, la suspension est centrifugée 15 minutes à 15000g. Le surnageant est éliminé et le culot lavé dans les mêmes conditions par de l'éthanol 70%. Après séchage, l'ADN est repris dans 50 µl de tampon TE.

100 ng d'ADN amplifié sont ligués à 50 ng de
20 vecteur pGEM-T dans un mélange réactionnel final de 10 µl, en présence de 2 µl de tampon 5X (GIBCO BRL) et de 1 unité de T4 ADN ligase (GIBCO BRL), pendant une nuit à 14°C. La souche de *E. coli* DH5α (GIBCO BRL) de génotype : F- ; endA1 ; hsdR17 (K-, mK-) ; supE44 ; Thi-1 ; λ- ;
25 recA1 ; gyrA96 ; relA1, a été utilisée. Les protocoles utilisés pour la préparation des bactéries compétentes et ceux pour la transformation sont décrits par HANAHAN, DNA cloning, vol. 1, DM Glover (ed) IRL Press, p. 109-135, (1985). Le mélange de ligation a été utilisé pour trans-
30 former les bactéries compétentes DH5α. Les colonies obtenues ont été sélectionnées sur boîtes LB (bactotryptone 10 g/l, extrait de levure 5 g/l, NaCl 10 g/l) plus ampicilline (50 µg/ml). L'ADN des clones obtenus est ensuite extrait et analysé par digestion enzymatique [SAMBROOK et
35 al., *Molecular Cloning : A laboratory manuel* Cold Spring

Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor HN.Y., (1989)]. Un clone possédant l'insert de 1260 pb a été sélectionné. Le plasmide obtenu, appelé pGEMT-GPD1 est représenté sur la figure 3.

5 L'insert a été séquencé par la méthode enzymatique de terminaison de chaîne [SANGER et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, p. 5463-5467, (1977)] à l'aide du séquenceur automatique A370 piloté par le logiciel A373 (APPLIED BIOSYSTEMS). Les amorces couplées aux ddNTP
10 fluorescents qui ont été utilisées sont le T7 et M13 reverse. Les réactions de séquence ont été réalisées à l'aide du kit "PRISM Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing kit" (APPLIED BIOSYSTEMS) sur l'appareil thermocycleur Perkin-Elmer Cetus modèle 9600, conformément
15 aux indications du fournisseur.

- Les séquences obtenues ont été analysées à l'aide du logiciel DNA Strider 1,0 [MARCK, (1988)], et les recherches d'homologie ont été effectuées sur le programme FASTA avec la banque de données EMBL de Heidelberg
20 et GENE BANK. La séquence d'au moins 300 bases de chaque brin du fragment cloné a été ainsi réalisé. Une identité de 100% a été trouvée avec la séquence de GPD1 publiée [LARSSON et al., Mol. Microbiol. 10, p. 1101-1111, (1993)], ce qui confirme que le fragment amplifié correspond bien au gène GPD1.
25

EXEMPLE 2 : SUREXPRESSION DE GPD1 DANS LA LEVURE S. CEREVISIAE ScV5M.

Afin d'obtenir une expression forte et constitutive de GPD1 dans la levure, la région codante de GPD1
30 a été placée sous le contrôle d'éléments régulateurs (promoteur et terminateur) de levure, dans un vecteur navette levure/*E. coli*.

1) Introduction de GPD1 sur le plasmide multicopie pVT100-U

35 Le plasmide d'expression pVT100-U a été utilisé (figure 4). Ce plasmide contient l'origine de répli-

cation de levure 2 μ , le marqueur de sélection URA3 et les éléments régulateurs forts ADH (promoteur et terminateur de l'alcool déshydrogénase I), ainsi que les éléments bactériens (origine de répllication et gène de résistance à l'ampicilline). Ce plasmide a été décrit par [VERNET et al., Gene, 52, p. 225-233, (1987)].

Le produit d'amplification obtenu comme décrit à l'exemple 1, 2), a été digéré par XhoI et BamHI. 100 ng de ce fragment digéré ont été ligués à 50 ng de vecteur pVT100-U digéré par XhoI et BamHI et déphosphorylé. Après transformation de bactéries et sélection des clones recombinants comme décrit à l'exemple 1, 3), plusieurs clones recombinants ont été obtenus. La carte du plasmide recombinant obtenu, appelé pVT100-U-GPD1, est représenté à la figure 4.

2) Transformation de la levure

La souches de levure *Saccharomyces cerevisiae* ScV5M a été transformée par le vecteur pVT100-U-GPD1 et par le vecteur pVT100-U (contrôle).

La méthode de transformation utilisée est celle de l'acétate de lithium décrite par ITO et al. (J. Bacteriol., 1983, 153, 163-168)).

Le milieu sélectif utilisé est du YNB (Yeast nitrogen base 7 g/l DIFCO, glucose 20 g/l). L'absence d'uracile permet de conserver une pression de sélection pour les plasmides. Plusieurs clones recombinants ont été obtenus. Le clone SIM7 a été étudié par la suite.

3) Conséquences de la surexpression de GPD1

a) Obtention d'anticorps polyclonaux anti-GPD1p

Des anticorps polyclonaux anti-GPD1p ont été utilisés comme outil lors de cette étude. Ils ont été produits par injection à un lapin d'une préparation purifiée de la protéine GPD1p. La purification de cette protéine a été réalisée à partir de la souche oenologique S267 : levure I.C.V. (88. 117.0), comme décrit ci-après :

- Préparation de l'extrait brut

10 litres de milieu YEPD sont ensemencés avec S267, à partir d'une préculture de 12 heures sur le même milieu. La culture est recueillie en fin de phase exponentielle et les cellules sont récupérées par centrifugation, 5 minutes à 4000g. Le culot est ensuite lavé avec du NaCl 0,9% et les cellules sont reprises dans un volume (v/w) de tampon A pH 7,0 (Tris-H₂SO₄ 10 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, NaN₃ 0,02%, PMSF 1 mM, sulfate de protamine 0,7%).

On ajoute à 30 ml de suspension cellulaire, 15 g de billes de verre (diamètre 0,5 mm) et on effectue un broyage à l'aide d'un appareil de type B. BRAUN pendant 4 minutes à 4°C. Le surnageant est récupéré après centrifugation à 20000 g, 20 minutes et conservé à 4°C.

- Précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium

L'extrait brut est soumis à une précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium (40% de saturation). Le surnageant obtenu est soumis à une précipitation à 60% de saturation. Le culot contenant la protéine active est resuspendu dans 50 ml de tampon A.

- Chromatographie échangeuse d'anions

L'extrait brut est dialysé 48 h contre du tampon A, puis déposé à 4°C et à raison de 20 ml/h sur une colonne (l=10 cm, diamètre = 1,6 cm) de DEAE-Sépharose CL6B (PHARMACIA), préalablement équilibrée avec du tampon B (Tampon A sans PMSF ni sulfate de potassium). Après élimination des protéines non retenues par passage de trois volumes de tampon d'équilibrage, un gradient linéaire de Tris-H₂SO₄ pH 7,0 compris entre 0 et 1M a été appliqué. L'enzyme est éluée pour une concentration en Tris-H₂SO₄ de 300 mM.

- Chromatographie d'exclusion moléculaire

Après concentration, la fraction enzymatique obtenue a été déposée sur colonne (l=40 cm, diamètre = 1,6 cm) de Sephadex-G100 (domaine de fractionnement 10000

à 120000 Da). L'élution est effectuée avec du tampon B, à raison de 5 ml/h. Les fractions (5ml) sont récupérées et l'activité de l'enzyme mesurée. L'enzyme est éluée entre 35 et 50 ml de tampon. Les fractions comprises entre 36 et 48 ml de volume d'élution sont conservées.

- Chromatographie d'affinité

La fraction enzymatique obtenue a été déposée sur une colonne contenant une résine de Blue Sépharose CL-6B sur laquelle est fixé un analogue du NAD⁺, le bleu Cibacron F3G-A. La colonne (l=5 cm, diamètre = 1,6 cm) est équilibrée à 4°C avec le tampon B et l'échantillon est déposé à raison de 6 ml/h. La colonne est ensuite lavée avec 10 volumes de colonne (tampon B). L'élution de l'enzyme fixée a été obtenue par utilisation d'un gradient mixte linéaire de Tris-H₂SO₄ (0 à 1,5 M) et de NADH (0 à 3 mM). Des fractions de 1 ml sont récupérées et l'activité de l'enzyme mesurée. L'enzyme est décrochée à 1 M de Tris-H₂SO₄ et 2 mM de NADH.

- Electrophorèse en conditions dénaturantes

L'extrait purifié a été soumis à une électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE), et la bande protéique (43 kDa) correspondant à GPD1p a été découpée et réduite en poudre. Les anticorps ont été produits par la société APPLIGENE, par injection à un lapin. Le sérum est récolté au bout de deux mois. La spécificité des anticorps a été testée par Western Blot. Les membranes de nylon-nitrocellulose obtenues après transfert des protéines à partir du gel sont révélées comme décrit par SAMBROOK et al. [Molecular Cloning : A laboratory manual Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y., (1989)], à l'aide d'immunoglobulines de chèvre anti-lapin couplées à la phosphatase alcaline comme réactif secondaire et le complexe 5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate/nitro blue tetrazolium comme substrat chromogène.

b) Conditions de culture et de dosage :

Milieu

YNB [Yeast Nitrogen Base without amino-acid (DIFCO) 6,7 g/l, glucose 100 g/l, casamino-acid (DIFCO) 5 g/l, pH 3,4]. Le milieu utilisé ne contient pas d'uracile, ce qui assure une pression de sélection pour les plasmides.

Conditions de culture

10 ml de milieu sontensemencés par les souches de levure. La croissance est réalisée en Erlenmeyer à 28°C, sans agitation. Les cultures sont réalisées en anaérobiose, en fermenteurs de 250 ml remplis avec 200 ml de milieu, placés à 28°C. Les fermenteurs sontensemencés à partir de la préculture, à raison de 10^6 cellules/ml.

15 La croissance est suivie par prélèvement d'une fraction aliquote de milieu de culture et estimation du nombre de cellules sur un appareil de type Coulter counter (ZBI).

Les métabolites sont dosés dans le surnageant, après centrifugation à 2000 g pendant 3 minutes, des prélèvements sont réalisés.

Dosage des métabolites :

Glucose

Le glucose a été dosé par la méthode de dosage des sucres réducteurs (DNS). Le dosage est réalisé en ajoutant, à un volume de la solution à doser, un volume de réactif (300 g de tartrate de sodium et de potassium, 16 g de NaOH et 10 g d'acide dinitro 3,5 salicylique). Le mélange est placé à 100°C pendant 5 minutes. La réaction est arrêtée dans un bain à 4°C. 10 volumes d'eau sont ajoutés. La densité optique est déterminée à 540 nm et la concentration en glucose est déterminée par comparaison des valeurs déterminées pour une gamme étalon de 0 à 2 g de glucose ou par HPLC comme précisé ci-dessous.

Glucose, Glycérol, éthanol, Acétaldéhyde :

Le glycérol et l'acétaldéhyde ont été dosés par voie enzymatique à l'aide des kits de dosage correspondants, commercialisés par BOEHRINGER.

- 5 Tous ces métabolites, excepté l'acétaldéhyde ont également été dosés en parallèle par HPLC selon les conditions suivantes : colonne Aminex HPX 87H Biorad, phase mobile acide sulfurique 8 mN, débit 0,6 ml/mn, à 45°C, détection réfractomètre.

10 Mesure des activités enzymatique

- Les cellules ont été récupérées à partir de culture, par centrifugation 3 minutes à 2000 g, et lavées avec un tampon KH_2PO_4 50 mM, pH 6,5. 100 mg de levure (poids humide) sont alors broyées par addition de 1 g de billes de verre (diamètre = 0,5 mm) et 0,5 ml de tampon imidazole 20 mM pH 7,0 contenant 1 mM DTT. Le tube est agité 1 minute au vortex et placé 1 minute dans la glace. L'opération est répétée 5 fois. Après centrifugation 1 minute à 5000 g, le surnageant est récupéré et constitue l'extrait acellulaire. Les protéines sont dosées à l'aide d'un kit BCA Protein Assay Reagent (PIERCE). L'activité glycérol-3-phosphate déshydrogénase (EC 1.1.1.8) est déterminée par la méthode décrite par GANCEDO (Eur. J. Biochem., 1968, 5, 165-172).

25 c) Résultats

- Des fermentations en milieu YNB, décrit ci-dessus, ont été réalisées avec les deux souches transformées par pVT100-U et pVT100-U-GPD1 (SIM7).

- La souche ScV5M transformée par pVT100-U (témoin) et SIM7 ont été testées pour leur capacité à produire du glycérol au cours de fermentations en conditions proches des conditions oenologiques.

- La croissance et la production de glycérol dans le milieu de culture ont été suivies au cours de la fermentation (figures 5 et 6). La quantité de glycérol produite est exprimée en fonction de l'avancement de

réaction ($1-S/S_0$) ou S représente la concentration en glucose à l'instant, t et S_0 la concentration initiale. La souche SIM7 surexprimée pour le gène GPD1 produit une quantité de glycérol largement supérieure à la souche témoin transformée par le plasmide seul pVT100-U. La production finale atteint 14 g/l pour la souche SIM7 contre 4 g/l pour la souche témoin (figure 6).

Une augmentation très importante de l'activité GPDH est observée dans la souche SIM7 par rapport à la souche témoin (figure 7, dans laquelle les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations, les barres verticales illustrent les écart-types). L'activité GPDH augmente de façon très rapide, et ce, dès le début de la croissance, pour atteindre un maximum à l'entrée en phase stationnaire (figures 5 et 7). Ce maximum est de l'ordre de 180 mU par milligramme de protéine, soit près de 2,5 fois l'activité observée dans la souche témoin (figure 7). Cette activité diminue ensuite, les niveaux atteints étant alors comparables à ceux de la souche témoin. Dans la souche témoin, l'activité GPDH est relativement faible en début de fermentation et atteint un maximum d'environ 75 mU/mg de protéine à un avancement de réaction de 0,6. Les cellules sont alors en phase stationnaire de croissance (figure 5).

Afin de confirmer que l'augmentation d'activité chez SIM7 est liée à une surproduction de la protéine codée par GPD1, la production de cette protéine a été suivie dans les deux souches par immunodétection à l'aide d'anticorps polyclonaux dirigés contre la protéine GPD1. Les résultats sont montrés pour la souche SIM7 (figure 8).

Différents prélèvements ont été réalisés au cours de la fermentation. Les protéines d'un extrait brut préparé comme décrit ci-dessus ont été séparées par électrophorèse SDS-PAGE et transférées sur membrane de nylon-nitrocellulose. Les anticorps polyclonaux obtenus

sont alors fixés sur la membrane et révélés par des anticorps anti-lapin couplés à la phosphatase alcaline [SAMBROOK et al., 1989, précité]. La protéine *GPD1p* est détectée pour la souche surexprimant *GPD1* durant la phase
5 exponentielle de croissance et reste produite à un niveau comparable jusqu'à la fin de la fermentation (figure 8). Par contre, la protéine *GPD1p* n'est pas détectée dans la souche témoin excepté pour les points situés entre 0,4 et 0,6 d'avancement de réaction, qui correspondent au pic
10 d'activité *GPDH* observé (résultats non montrés).

Une corrélation étroite est observée entre la surproduction de glycérol (figure 6) et la surproduction de *GPD1p* (figure 8). Par contre, la chute d'activité *GPDH* observée pendant la deuxième partie de la fermentation,
15 alors que la protéine est toujours surproduite, est en contradiction avec l'importance de la production de glycérol observée également pendant cette deuxième moitié de la fermentation. Cette chute d'activité *in vitro* peut refléter une inactivation partielle de l'enzyme *in vivo*.
20 Cependant, on peut exclure une légère instabilité de la protéine pendant cette phase tardive, puisque dans les conditions expérimentales utilisées, la réponse immunologique n'est pas quantifiable de façon précise.

La croissance de la souche *SIM7* et de la
25 souche témoin a été comparée (figure 9). Malgré une différence au niveau de la biomasse finale atteinte, le taux de croissance est exactement le même pour les deux souches. Il est de 0,54 générations par heure. D'autre part, tout le glucose présent dans le milieu de culture
30 (100 g/l initialement) est dégradé par les deux souches (figure 10).

La voie de production du glycérol est donc amplifiée de façon importante, ce qui doit résulter en une utilisation accrue de *NADH*. Afin de voir si la
35 cellule, pour maintenir sa balance d'oxydoréduction, corrige ce déséquilibre par une diminution de la produc-

tion d'éthanol, elle même consommatrice de NADH, la production d'éthanol en fin de fermentation a été mesurée dans les deux souches et les résultats sont illustrés au Tableau I.

- 5 Tableau I : Production d'éthanol chez SIM7 et ScV5M-pVT100-U pendant la fermentation alcoolique sur milieu YNB avec 100 g/l de glucose.

Souche	Ethanol g/l	glycérol/glucose
ScV5M-pVT100-U	46,8	0,04
ScV5M-pTV100-U-GPD1	37,5	0,13

- 10 Une diminution importante (de l'ordre de 10 g/l) de la quantité d'éthanol produite par la souche SIM7 est effectivement observée.

- Cette diminution de production d'éthanol, résultant de la moindre disponibilité en NADH nécessaire à la transformation de l'acétaldéhyde en éthanol par
15 intervention de l'alcool déshydrogénase I, l'évolution de la production d'acétaldéhyde a été suivie, au cours de la fermentation (figure 11). En accord avec la diminution de production d'éthanol, une accumulation d'acétaldéhyde est observée dans la souche surexprimée pour GPD1. La concen-
20 tration finale d'acétaldéhyde en fin de fermentation est de l'ordre de 150 mg/l et reste donc très modérée.

- La surexpression de GPD1 se traduit donc sur un milieu riche en sucres, par une augmentation très importante de la production de glycérol, contrebalancée
25 par une diminution de la production d'éthanol.

- Fermentation sur moût synthétique

- La production de glycérol est proportionnelle à la quantité initiale de glucose présent dans le milieu de culture. Ceci a été montré en testant la production de
30 glycérol par les souches ScV5M-pVT100-U et ScV5M-pVT100-U-GPD1, sur milieu synthétique MS en présence de 2 concentrations en glucose. Le moût synthétique est un milieu mimant la composition de moûts naturels dont la

composition a été décrite par BELY M. et al. (*Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1990, 70, 246-252). La composition en azote de ce milieu a été modifiée de la façon suivante : 80 mg/l de NH_4Cl et 120 mg/l d'azote α aminé ont été utilisés. Deux concentrations en glucose 100 g/l et 200 g/l ont été testées. Les fermentations ont été réalisées dans des fermenteurs de 1 l. Par ailleurs, les autres conditions de culture et le suivi de fermentation ont été réalisés comme décrit ci-dessus. Les résultats de production de glycérol sont résumés dans le Tableau II :

TABLEAU II : Production de glycérol chez SIM7 et ScV5M-pVT100-U pendant la fermentation alcoolique sur milieu MS avec 100 et 200 g/l de glucose

Souche	Glycérol g/l	
	MS glucose 100 g/l	MS glucose 200 g/l
ScV5M-pVT100-U	non déterminé	6,6
ScV5M-pVT100-U-GPD1	19	27,9

Dans le cas de la fermentation dans un milieu contenant 200 g/l de glucose, le rapport glycérol produit/glucose initial est significativement différent pour la souche ScV5M-pVT100-U-GPD1 (0,14) par rapport au rapport obtenu avec la souche contrôle ScV5M-pVT100-U (0,03).

Une augmentation très importante de la production de glycérol est observée en présence de 200 g/l de glucose par rapport à une fermentation réalisée sur 100 g/l de glucose. Afin de déterminer les conséquences de cette importante production de glycérol sur la teneur en éthanol, la production d'éthanol en fin de fermentation a été mesurée sur ce milieu et les résultats sont illustrés au Tableau III.

Tableau III : Production d'éthanol chez SIM7 et ScV5M-pVT100-U pendant la fermentation alcoolique sur milieu MS avec 200 g/l de glucose.

Souche	Ethanol g/l
ScV5M-pVT100-U	86,7
Scv5M-pVT100-U-GPD1	74

5 La production très importante (27,9 g/l) de glycérol sur milieu MS 200 g/l de glucose s'accompagne d'une diminution de la production d'éthanol d'environ 13 g/l.

10 **EXEMPLE 3 : Surexpression de GPD1 dans la levure oenologique *S. cerevisiae* K1 (Languedoc) en conditions oenologiques.**

1) Introduction du marqueur de sélection positif ZEO sur le plasmide multicopie pVT100-U-GPD1 :

15 Les souches industrielles oenologiques étant prototrophes, un marqueur positif dominant a été introduit sur le vecteur pVT100-U-GPD1, afin de pouvoir sélectionner des transformants de la souche K1.

20 La cassette « promoteur TEF1-gène ZEO-terminateur CYC1 » a été isolée à partir du vecteur pUT 332 (WENZEL T.J. et al., Yeast, 1992, 8, 667-668), par PCR à l'aide des oligonucléotides décrits à la figure 12. Ces amorces permettent d'introduire des sites HpaI aux extrémités du fragment amplifié.

25 L'amplification a été réalisée de la manière suivante :

Oligonucléotide (1)	5 µl (20 pmoles)
Oligonucléotide (2)	5 µl (20 pmoles)
Tampon TaQ 10X	10 µl
dNTP 2 mM	10 µl
30 MgCl ₂ 25 mM	6 µl
pUT332 (50 ng/µl)	1 µl

TaQ 0,5 µl

Eau 52,5 µl

30 cycles (30 sec 94°C, 30 sec 45°C, 1 min 72°C).

5 Le fragment de 1175 pb amplifié a été analysé sur gel d'agarose 0,8 %, puis digéré par HpaI, et purifié sur gel d'agarose à bas point de fusion. La bande d'agarose contenant le fragment a été découpée et utilisée directement dans le mélange de ligation. Trente ng de
10 fragment ainsi obtenu ont été ligués à 50 ng de plasmide pVT100-U-GPD1 digéré par HpaI et déphosphorylé, pendant une nuit à 20°C, en présence de 2 unités de T4 DNA ligase. Après transformation de bactéries et sélection des clones recombinants, plusieurs clones ayant la struc-
15 ture attendue ont été obtenus. La carte du plasmide recombinant obtenu, appelé pVT100U-ZEO-GPD1, est représentée à la figure 13.

2) Transformation de la levure :

La souche de levure oenologique *S. cerevisiae*
20 K1 a été transformée par le vecteur pVT100U-ZEO-GPD1 et par le vecteur pVT100U-ZEO (contrôle), par la méthode de transformation à l'acétate de lithium décrite par ITO et al. (1983). Le milieu sélectif utilisé est du YEPD (extrait de levure 10 g/l, bacto peptone 20 g/l, glucose
25 20 g/l) contenant 40 µg/ml de phléomycine.

3) Conséquences de la surexpression de GPD1 en conditions de fermentation oenologique :

10 ml de moût synthétique (décrit à l'exemple
2) sont ensemencés par les souches de levure. La croissance est réalisée en tube pendant 24 h à 28°C. Les cul-
30 tures sont réalisées en anaérobiose, en fermenteurs de 220 ml, remplis avec 200 ml de même milieu et placés à 28°C sous agitation à l'aide d'un barreau aimanté. Les fermenteurs sont ensemencés à partir de la préculture à
35 raison de 10⁶ cellules/ml. La croissance est suivie par

prélèvement de fractions aliquotes de milieu de culture et estimation du nombre de cellules sur un appareil de type Coulter counter (ZBI). Les métabolites sont dosés dans le surnageant, après centrifugation à 2 000 g pendant 3 minutes.

* Dosage des métabolites :

Glucose, glycérol, éthanol, acétate, succinate, pyruvate, acétoïne et butane-diol : sont dosés par HPLC conformément au protocole décrit à l'exemple 2.

10 L'acétaldéhyde est dosé par voie enzymatique (Boehringer). La méthode d'extraction du butane-diol utilisée est celle précédemment décrite (HAGENAUER-HENER U. et al., Dtsch. Lebensm. Rundsch., 1990, 86, 273-276).

* Résultats :

15 Des fermentations sur moût synthétique ont été réalisées avec les souches K1/pVT100U-ZEO (K₁-pVTU) et K1/pVT100U-ZEO-GPD1 (K₁-GPD1). Les différents métabolites ont été dosés après consommation complète du sucre. Les résultats présentés sur la figure 14 montrent une produc-

20 tion de glycérol de 14 g/l pour la souche surexprimée pour GPD1 au lieu de 6,9 g/l pour la souche témoin. Cette surproduction de glycérol s'accompagne d'une diminution de la production d'éthanol d'environ 8 g/l (80 g/l contre 88,4 g/l). Cette déviation du flux carboné vers le glycé-

25 rol entraîne une augmentation d'un facteur 2 environ de la concentration finale en acétaldéhyde, pyruvate et acétate. Des variations plus importantes sont observées au niveau du succinate (1,8 g/l contre 0,5 g/l) et du 2,3 butane-diol (1,1 g/l contre 0,25 g/l).

30 Dans le cas de la fermentation dans un milieu contenant 200 g/l de glucose, le rapport glycérol produit/glucose initial est significativement différent pour la souche K₁-GPD1 (0,07) par rapport au rapport obtenu avec la souche contrôle K₁-pVT100-U-ZEO (0,03).

35 Ces résultats s'expliquent par le déséquilibre de la balance redox engendré par la surexpression de

GPD1. Le NADH, préférentiellement réduit en NAD par la voie GPDH, devient limitant pour la conversion de l'acétaldéhyde en éthanol. Il en résulte une diminution de la quantité d'éthanol formé, ainsi qu'une accumulation
5 d'acétaldéhyde, d'acétate et de pyruvate. Les variations de ces métabolites en fin de fermentation restent toutefois mineures. L'accumulation de succinate et de butane-diol pourraient être un moyen de détoxification de la cellule par rapport à l'acétaldéhyde. Les voies par
10 lesquelles ces deux composés sont accumulés n'ont pas été étudiées. Cependant, dans l'hypothèse où le succinate est formé par la voie oxydative du cycle de Krebs, sa formation pourraient permettre à la cellule de régénérer un peu de NADH. Au contraire, la formation de 2,3 butane-
15 diol (produit de réduction de l'acétoïne), à partir de l'acétaldéhyde, non avantageuse au niveau redox, serait plutôt un moyen de détoxification. Au niveau des incidences prévisibles des modifications métaboliques observées, il faut noter que les concentrations de tous ces
20 métabolites restent dans une gamme compatible avec des concentrations pouvant être observées dans les boissons fermentées et notamment dans le vin y compris pour le succinate (0,5-2 g/l, RADLER F., *Wine microbiology and biotechnology*; Harwood Academic Publishers, 1992, Ed G.
25 Fleet.Chur, Suisse) et le 2,3 butane-diol (0,3-1,3 g/l, RIBEREAU-GAYON et al., *Traité d'oenologie*, 1972). De plus, des quantités élevées de succinate pourraient être avantageuses dans le vin, par le biais du caractère acide qu'il pourrait apporter.

30 Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent ve-
35 nir à l'esprit du technicien en la matière, sans

s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

REVENDEICATIONS

1°) Souches de levures, caractérisées en ce qu'elles sont sélectionnées parmi des souches de *Saccharomyces*, en ce qu'elles contiennent au moins un
5 fragment d'un gène codant pour une glycéról 3 phosphate déshydrogénase NADH-dépendante (GPDH), lequel fragment est modifié par des séquences de régulation actives dans la levure comportant un promoteur fort, pour augmenter la production de glycéról et réduire la production
10 d'éthanol, dans un milieu riche en sucres pendant la fermentation alcoolique.

2°) Souches de levures selon la revendication 1, caractérisées en ce qu'elles sélectionnées parmi des souches de *Saccharomyces* industrielles, notamment des
15 souches oenologiques, de distillerie, de brasserie, de boulangerie ou de cidrerie.

3°) Souches de levures selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisées en ce qu'elles appartiennent à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*.

20 4°) Souches de levures selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisées en ce qu'elles contiennent au moins deux copies du gène codant pour une GPDH NADH-dépendante.

25 5°) Cassette d'expression, caractérisée en ce qu'elle comprend un gène codant pour une GPDH NADH-dépendante de levure associé à des séquences de régulation actives dans la levure.

30 6°) Vecteurs d'expression, comprenant une cassette d'expression selon la revendication 5, et utilisables pour l'obtention des souches de levures transformées selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.

35 7°) Vecteurs selon la revendication 6, caractérisés en ce qu'il s'agit de vecteurs navette, possédant également une origine de répllication bactérienne et un marqueur de sélection dans une bactérie.

8°) Boissons fermentées à teneur allégée en éthanol, caractérisées en ce qu'elles sont obtenues par fermentation alcoolique, en présence de souches de levures selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.

5 9°) Utilisation d'une souche de levure selon selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, pour la préparation de pain.

10 10°) Procédé de fermentation alcoolique à bilan de fermentation des sucres modifié, caractérisé en ce que pour augmenter la production de glycérol et réduire la production d'éthanol, ledit procédé comprend :

(1) la transformation d'une souche de levure *Saccharomyces* par un vecteur surexprimant la protéine GPDH ; et

15 (2) l'ensemencement du milieu de fermentation, contenant au moins 30 g/l de sucres, avec la souche de levure transformée (transformant), obtenue en (1).

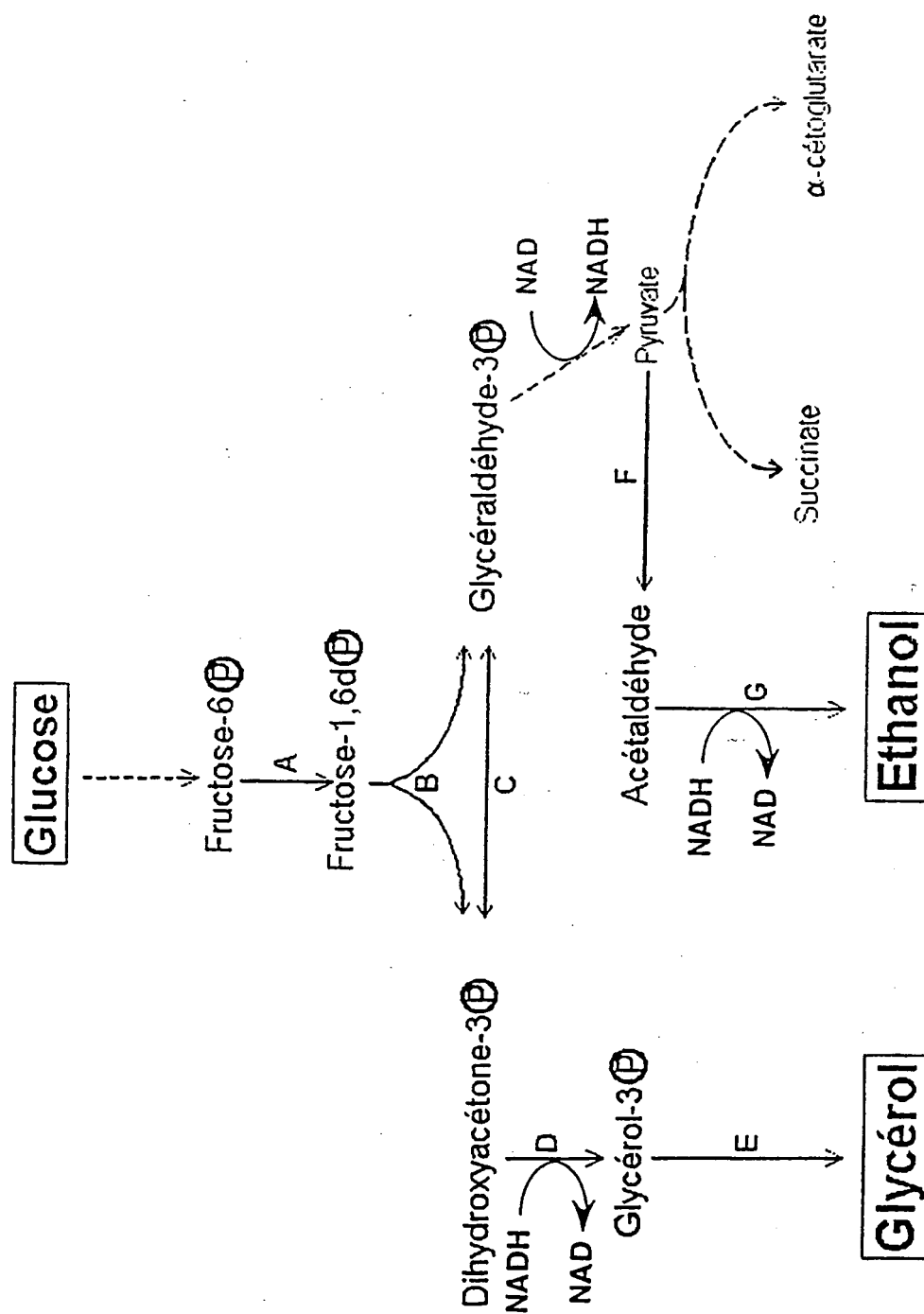


FIGURE 1

2/11



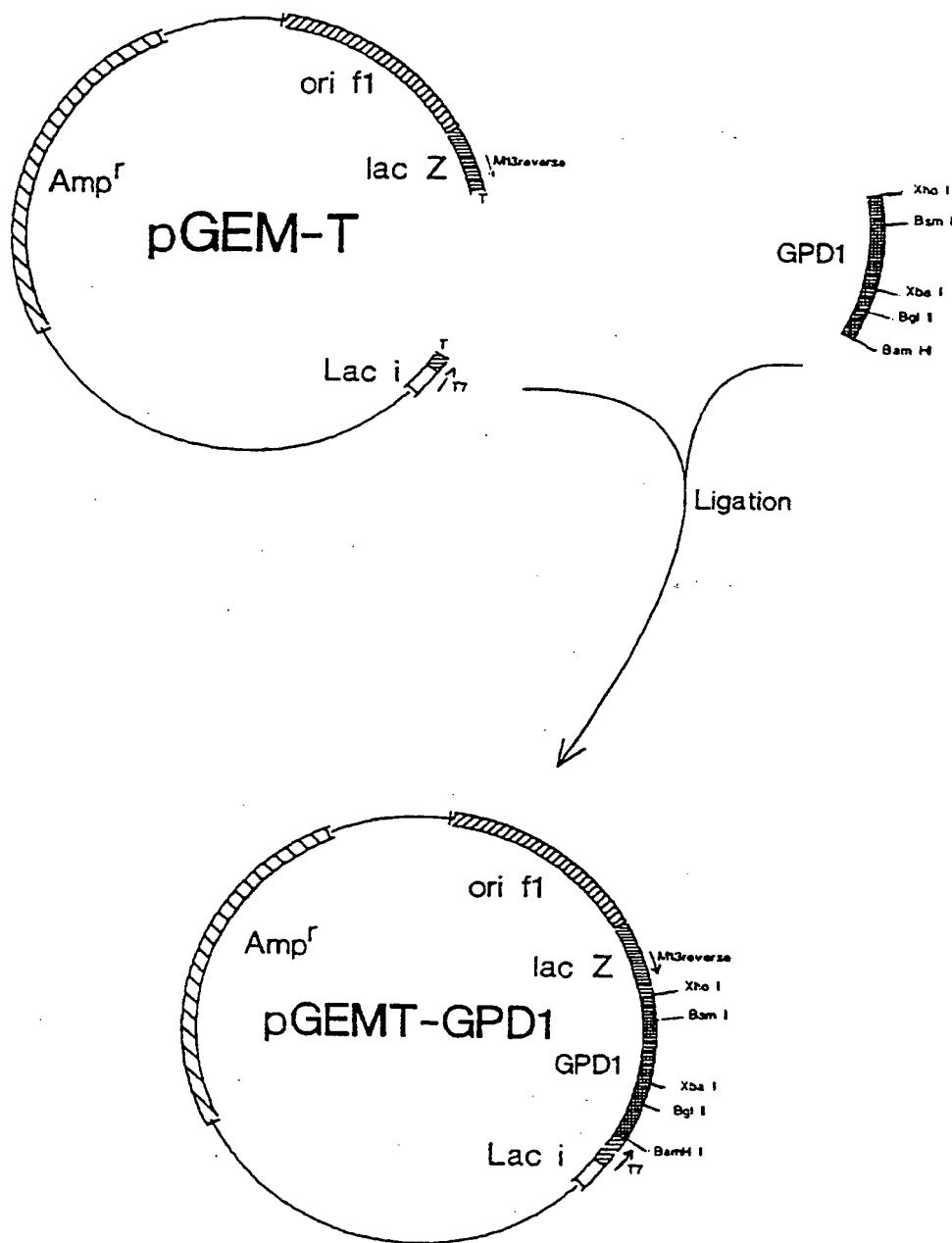
1
 CTT TAA TTT TCT TTT ATC TTA CTC TCC TAC ATA AGA CAT CAA GAA ACA ATT
 52
 GTA TAT TGT ACA CCC CCC CCC TCC ACA AAC ACA AAT ATT GAT AAT ATA AAG
 103
 ATG TCT GCT GCT GCT GAT AGA TTA AAC TTA ACT..... CAT GAA GAT
 1276
 TAG ATT TAT TGG AGA AAG ATA ACA TAT CAT ACT TCC CCC ACT TTT TTC GAG
 1327
 GCT CTT CTA TAT CAT ATT CAT AAA TTA GCA TTA TGT CAT TTC TCA TAA CTA
 1378
 CTT

Oligonucléotide O1: 5'-CGC-TCG-AGC-CCC-TCC-ACA-AAC-ACA-3'
 XhoI

Oligonucléotide O2: 5'-GCG-GAT-CCG-GGG-AAG-TAT-GAT-ATG-TT-3'
 BamHI

FIGURE 2

3/11

FIGURE 3

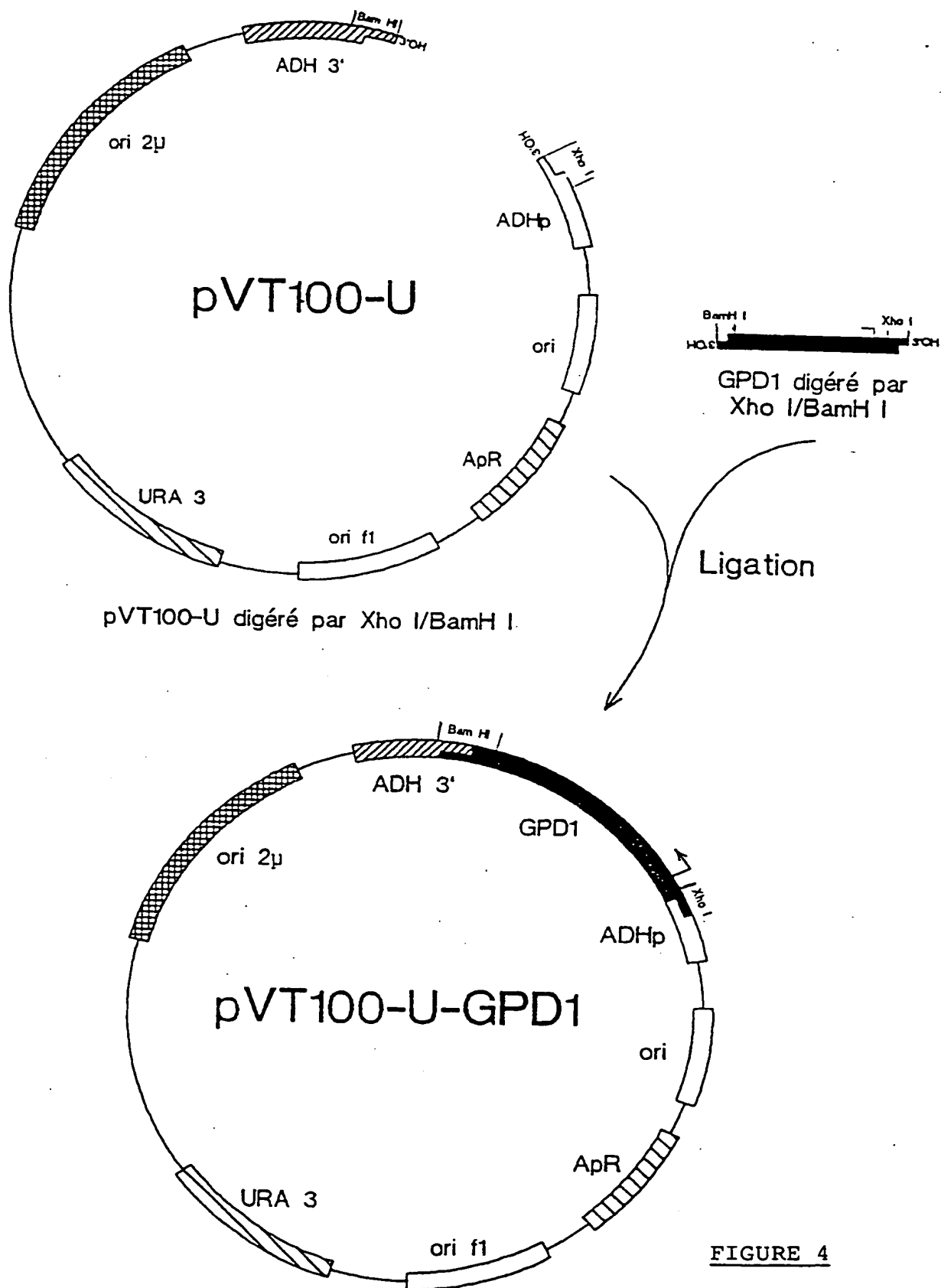


FIGURE 4

5/11

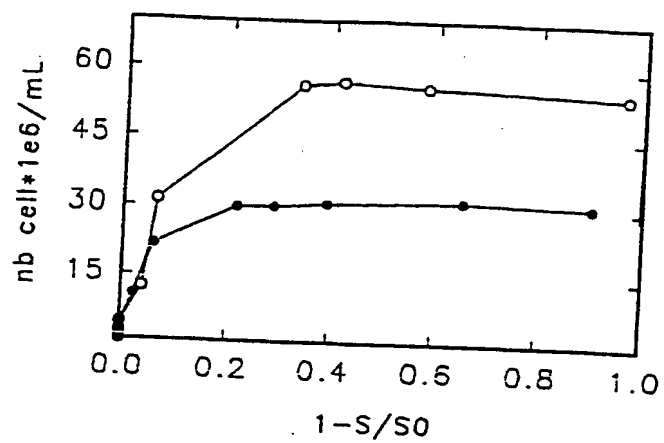


FIGURE 5

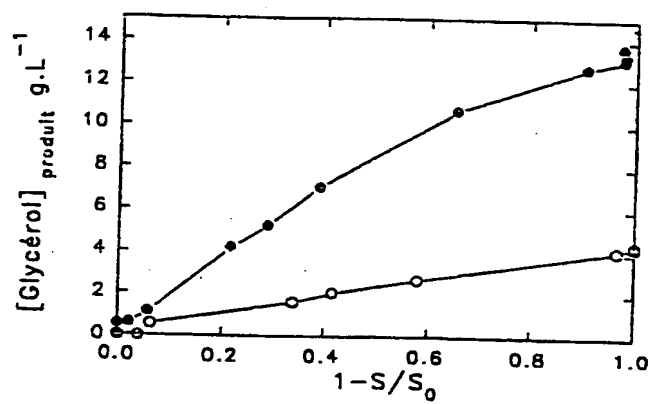
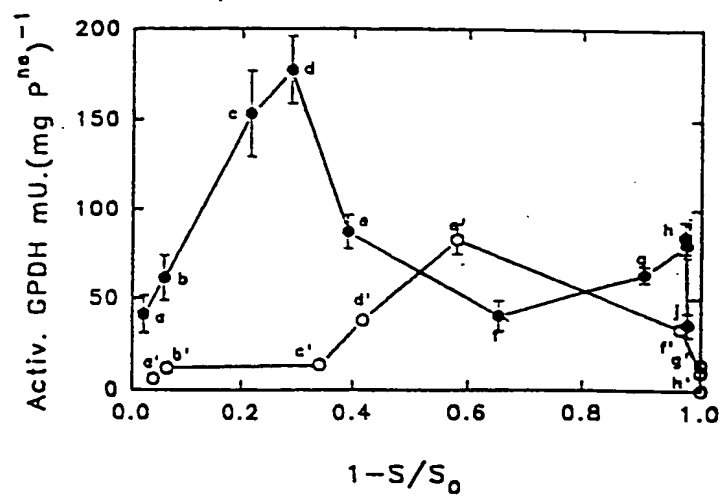
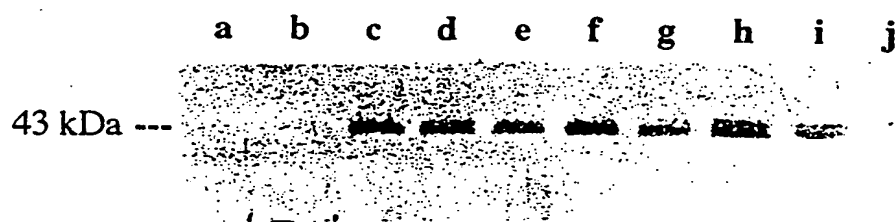
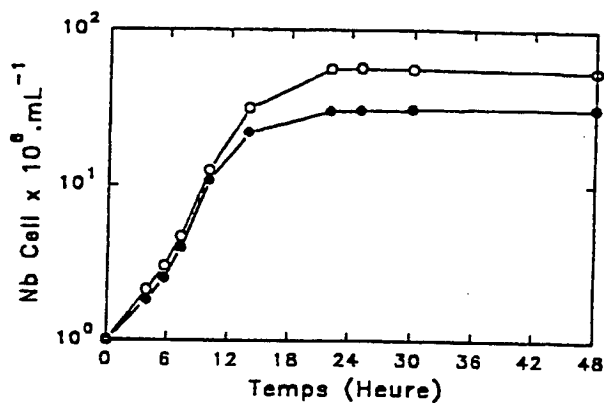
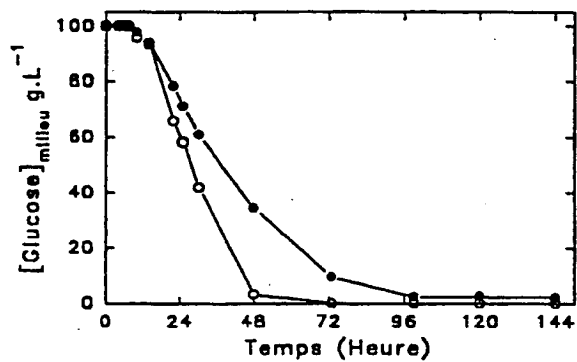


FIGURE 6

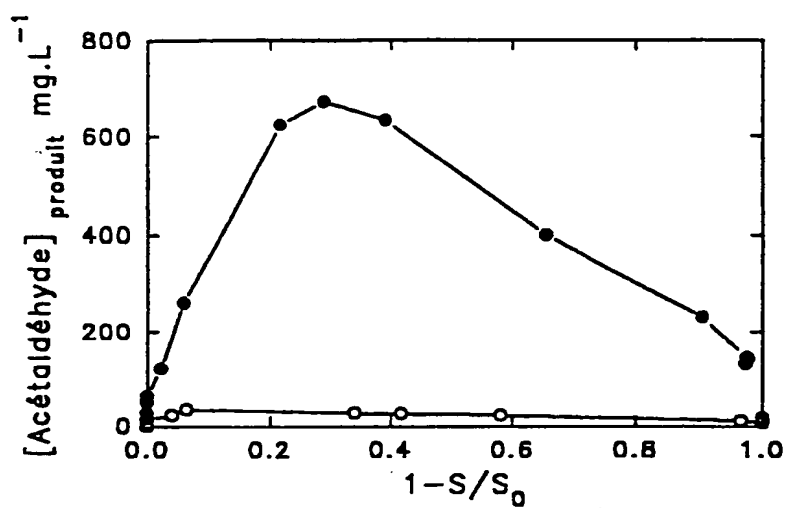
6/11

FIGURE 7FIGURE 8

7/11

FIGURE 9FIGURE 10

8/11

FIGURE 11

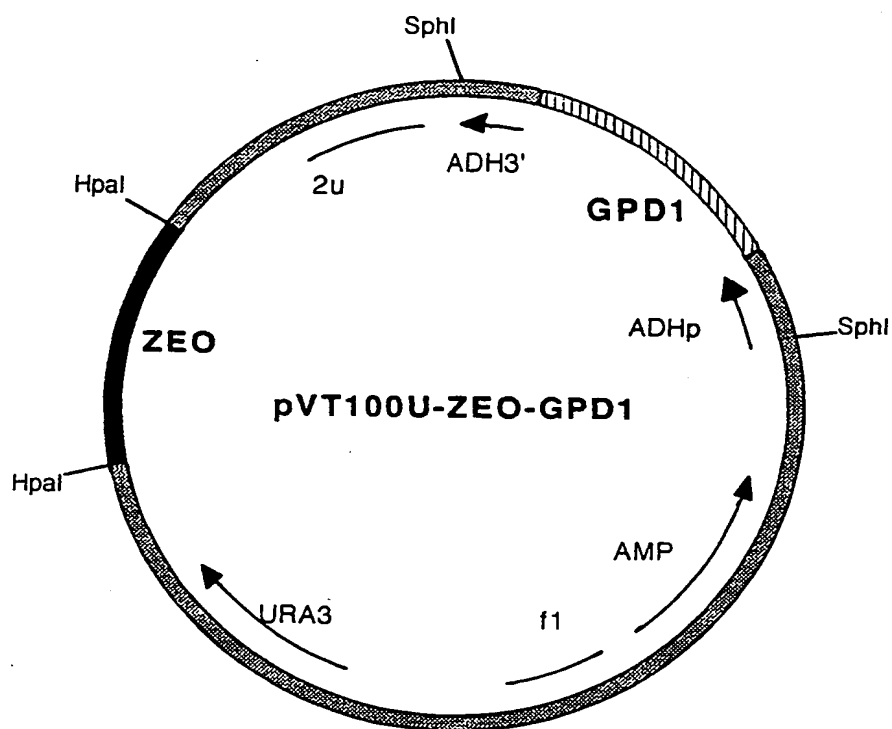
374
....CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT GAA TTC GAG CTC GGT ACC
Oligonucléotide (1)
407 1285
CGG GGG ATC CCC CCA CAC..... CTC GAA TTC GAA ATG ACC GAC
860 1327
CAA GCG ACG CCC AAC CTG..... CCT TTT CCT TTG TCG ATA TCA TGT
1351 1576
AAT TAG TTA TGT CAC GCT..... CGA AGG CTT TAA TTT GCA AGC
1594
TTG GCG TAA TCA TGG TCA TAG CTG TTT CCT GTG TGA AAT.....
Oligonucléotide (2)

Oligonucléotide (1): 5' - GCG TTA ACG ACG GCC AGT GAA T - 3'

Oligonucléotide (2): 5' - GCG TTA ACA GCT ATG ACC ATG AT - 3'

Figure 12: Position des oligonucléotides (1) et (2) par rapport à la séquence de pUT332.

10/11

**Figure 13**

11/11

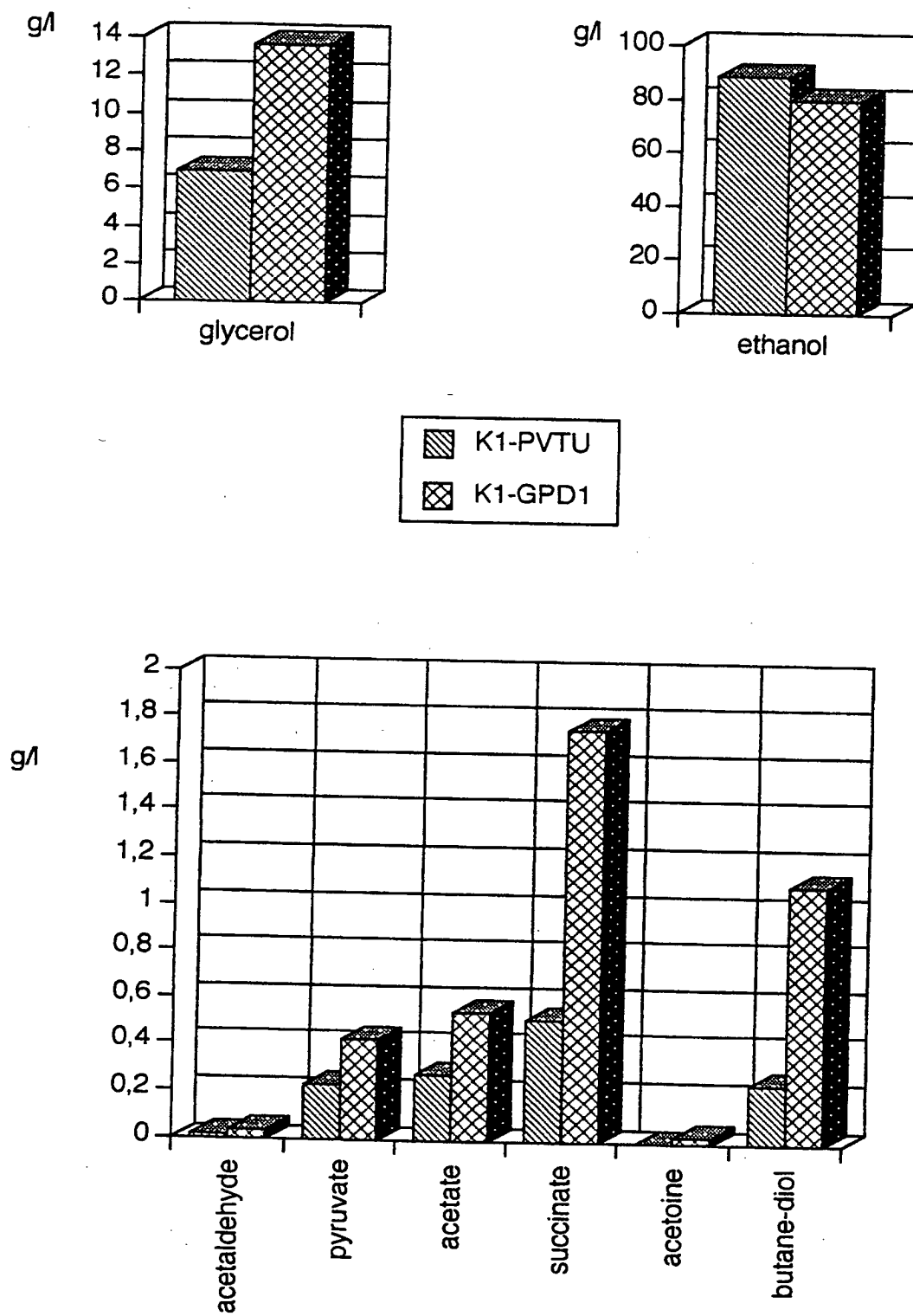


Figure 14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 96/00854

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 6	C12N15/81 C12P7/20	C12N1/18 C12N9/02 C12G3/08 A21D8/04
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 6 C12N C12G C12P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MOL. MICROBIOL. (1993), 10(5), 1101-11 CODEN: MOMIEE; ISSN: 0950-382X, XP002009263 LARSSON, KATRIN ET AL: "A gene encoding sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD+) complements an osmosensitive mutant of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> " cited in the application	1-7
Y	see the whole document --- -/--	8-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		
E earlier document but published on or after the international filing date		
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention		
X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone		
Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art		
& document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
24 July 1996		07. 08. 96
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016		Authorized officer Gurdjian, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 96/00854

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MOL. CELL. BIOL. (1994), 14(6), 4135-44 CODEN: MCEBD4;ISSN: 0270-7306, XP002009264 ALBERTYN, JACOBUS ET AL: "GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in Saccharomyces cerevisiae, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway" cited in the application see the whole document ---	1-10
Y	J. BACTERIOL. (1994), 176(22), 7091-5 CODEN: JOBAAAY;ISSN: 0021-9193, XP002009265 WANG, HWA-TANG ET AL: "Cloning, sequence, and disruption of the Saccharomyces diastaticus DAR1 gene encoding a glycerol-3-phosphate dehydrogenase" see the whole document ---	1-10
Y	EP,A,0 183 858 (HOLSTEN BRAUEREI AG) 11 June 1986 see page 3, paragraph 6 - page 4, paragraph 1; claims 1,10 ---	8,10
Y	EP,A,0 245 841 (HOLSTEN BRAUEREI AG) 19 November 1987 see page 2, line 31 - line 47 ---	8,10
Y	EP,A,0 128 524 (UNIVERSAL FOODS CORP) 19 December 1984 see claims 7,16-19 ---	9
A	MOL. MICROBIOL. (1995), 17(1), 95-107 CODEN: MOMIEE;ISSN: 0950-382X, XP002009266 ERIKSSON, PETER ET AL: "Cloning and characterization of GPD2, a second gene encoding sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD+) in Saccharomyces cerevisiae, and its comparison with GPD1" see the whole document ---	1-7
Y	WO,A,89 05861 (KAMPEN WILLEM HEMMO) 29 June 1989 see claim 11 -----	10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 96/00854

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0183858	11-06-86	AU-B- 589589	19-10-89
		AU-B- 5199386	18-06-86
		WO-A- 8603222	05-06-86
		JP-T- 62500839	09-04-87
		US-A- 5039531	13-08-91

EP-A-0245841	19-11-87	DE-A- 3616094	19-11-87
		AU-B- 602691	25-10-90
		AU-B- 7268187	19-11-87
		JP-A- 62272965	27-11-87
		US-A- 4814188	21-03-89

EP-A-0128524	19-12-84	US-A- 4643901	17-02-87
		AU-B- 572847	19-05-88
		AU-B- 2921484	13-12-84
		JP-A- 60070068	20-04-85

WO-A-8905861	29-06-89	AT-T- 123305	15-06-95
		CA-A- 1336584	08-08-95
		DE-D- 3853921	06-07-95
		DE-T- 3853921	22-02-96
		EP-A- 0393147	24-10-90
		FI-B- 96122	31-01-96
		RU-C- 2015165	30-06-94
		US-A- 5177009	05-01-93
		US-A- 5177008	05-01-93

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D Internationale No
PCT/FR 96/00854

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 6 C12N15/81 C12N1/18 C12N9/02 C12G3/08 A21D8/04 C12P7/20		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 C12N C12G C12P		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	MOL. MICROBIOL. (1993), 10(5), 1101-11 CODEN: MOMIEE; ISSN: 0950-382X, XP002009263 LARSSON, KATRIN ET AL: "A gene encoding sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD+) complements an osmosensitive mutant of Saccharomyces cerevisiae" cité dans la demande	1-7
Y	voir le document en entier --- -/--	8-10
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
<p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 24 Juillet 1996		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 07. 08. 96
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Gurdjian, D

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	MOL. CELL. BIOL. (1994), 14(6), 4135-44 CODEN: MCEBD4;ISSN: 0270-7306, XP002009264 ALBERTYN, JACOBUS ET AL: "GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in Saccharomyces cerevisiae, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway" cité dans la demande voir le document en entier ---	1-10
Y	J. BACTERIOL. (1994), 176(22), 7091-5 CODEN: JOBAAY;ISSN: 0021-9193, XP002009265 WANG, HWA-TANG ET AL: "Cloning, sequence, and disruption of the Saccharomyces diastaticus DAR1 gene encoding a glycerol-3-phosphate dehydrogenase" voir le document en entier ---	1-10
Y	EP,A,0 183 858 (HOLSTEN BRAUEREI AG) 11 Juin 1986 voir page 3, alinéa 6 - page 4, alinéa 1; revendications 1,10 ---	8,10
Y	EP,A,0 245 841 (HOLSTEN BRAUEREI AG) 19 Novembre 1987 voir page 2, ligne 31 - ligne 47 ---	8,10
Y	EP,A,0 128 524 (UNIVERSAL FOODS CORP) 19 Décembre 1984 voir revendications 7,16-19 ---	9
A	MOL. MICROBIOL. (1995), 17(1), 95-107 CODEN: MOMIEE;ISSN: 0950-382X, XP002009266 ERIKSSON, PETER ET AL: "Cloning and characterization of GPD2, a second gene encoding sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD+) in Saccharomyces cerevisiae, and its comparison with GPD1" voir le document en entier ---	1-7
Y	WO,A,89 05861 (KAMPEN WILLEM HEMMO) 29 Juin 1989 voir revendication 11 -----	10

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux familles de brevets

Document Internationale No
PCT/FR 96/00854

101711 50/00004

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0183858	11-06-86	AU-B- 589589	19-10-89
		AU-B- 5199386	18-06-86
		WO-A- 8603222	05-06-86
		JP-T- 62500839	09-04-87
		US-A- 5039531	13-08-91

EP-A-0245841	19-11-87	DE-A- 3616094	19-11-87
		AU-B- 602691	25-10-90
		AU-B- 7268187	19-11-87
		JP-A- 62272965	27-11-87
		US-A- 4814188	21-03-89

EP-A-0128524	19-12-84	US-A- 4643901	17-02-87
		AU-B- 572847	19-05-88
		AU-B- 2921484	13-12-84
		JP-A- 60070068	20-04-85

WO-A-8905861	29-06-89	AT-T- 123305	15-06-95
		CA-A- 1336584	08-08-95
		DE-D- 3853921	06-07-95
		DE-T- 3853921	22-02-96
		EP-A- 0393147	24-10-90
		FI-B- 96122	31-01-96
		RU-C- 2015165	30-06-94
		US-A- 5177009	05-01-93
		US-A- 5177008	05-01-93
